

6/11/65 31
7436

Docket No. 10806-193

CERTIFICATE OF MAILING

I hereby certify that this paper is being mailed with the United States Postal Service with sufficient postage as first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, Washington, DC 20231 on July 2, 2002

Lauren E. Morris

RECEIVED

AUG 01 2002

TECH CENTER 1600/2900

PATENT

COPY OF PAPERS
ORIGINALLY FILED

IN THE UNITED STATES PATENT & TRADEMARK OFFICE

Applicant: Peter NEUBAUER et al : Paper No.:
Serial No.: 10/070,787 : Group Art Unit:
Filing Date: March 12, 2002 : Examiner:

For: **Method for Increasing the Yield of Recombinant Proteins in Microbial Fermentation Processes**

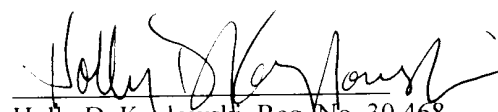
TRANSMITTAL OF CERTIFIED PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
Washington, DC 20231

Dear Sir:

The present application claims priority under 35 U.S.C. §119 of German Application No. 199 43 919.2 filed September 14, 1999. A certified copy of the priority application is enclosed.

Respectfully submitted.


Holly D. Kozlowski, Reg. No. 30,468
Dinsmore & Shohl LLP
1900 Chemed Center
255 East Fifth Street
Cincinnati, Ohio 45202
(513) 977-8568



RECEIVED

AUG 01 2000

TECH CENTER 1600:2900

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 43 919.2

Anmeldetag: 14. September 1999

Anmelder/Inhaber: Pharmacia AB, Stockholm/SE

Erstanmelder: Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg, Halle, Saale/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Steigerung der Ausbeute von rekombi-
nanten Proteinen in mikrobiellen Fermentationspro-
zessen

IPC: C 12 P, C 12 N

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 14. Juni 2002
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



Verfahren zur Steigerung der Ausbeute von rekombinanten Proteinen in mikrobiellen Fermentationsprozessen

Die Produktion rekombinanter Proteine in Bakterien erfolgt im industriellen Maßstab in Fermentoren. Eine Ertragssteigerung im Verhältnis zu Experimenten im Schüttelkolben-Labormaßstab wird über die Erhöhung der Zellmasse pro Volumen erreicht. Eine hohe Zelldichte kann durch die Fed-batch-Technik erzielt werden. Diese beruht auf der wachstumslimitierenden Zugabe einer Nährstoffquelle, wobei meistens die Kohlenstoff- und Energiequelle limitiert wird (z.B. Riesenberg D. and Guthke, R., 1999, Appl. Microbiol. Biotechnol. 51, 422-430). Bei *E. coli*-Prozessen ist dies beispielsweise Glucose oder Glycerol. Alternativ werden in Abhängigkeit vom genutzten Mikroorganismus und vom Prozeß aber auch andere Substrate angewandt, wie beispielsweise Melasse, Stärke, Pepton, Laktose, Methanol und Acetat. Die Zugabe der hochkonzentrierten Feedinglösung erfolgt kontinuierlich, wobei unterschiedliche Funktionen genutzt werden können, die die Zugabe der Substratlösung über die Zeit definieren, beispielsweise erfolgt die Zugabe mit konstanter Rate, exponentiell ansteigend beziehungsweise linear an- oder absteigend. Innerhalb eines Prozesses werden oft verschiedene Funktionen miteinander kombiniert. Die Zugabe der Substratlösung kann aber auch über andere Parameter geregelt werden. Hier verwendet man beispielsweise als Steuerparameter den Gelöstsauerstoff (DO-stat), den pH-Wert (pH-stat), oder die on-line ermittelten Konzentrationen von Kohlendioxid und Sauerstoff im Abgas.

Gängige Vektoren für die Genexpression sind Plasmide, die neben dem Replikationsorigin mindestens die für das gewünschte Protein kodierende DNA-Sequenz (Produktgen) sowie einen Selektionsmarker enthalten, der die stabile Erhaltung des Plasmids über den Kulturverlauf sichern soll. Die Expression des Produktgens wird üblicherweise über regulatorische Sequenzen, insbesondere über regulierbare Promotoren, gesteuert. Die Anschaltung der Expression des Produktgens erfolgt beispielsweise durch chemische Induktoren (Substrate, Substratanaloga), die Änderung der Kultivierungstemperatur oder anderer Kulturbedingungen (pH-Wert, Salzkonzentration, Höhe der Substratkonzentration). Insbesondere kann die Induktion auch durch einen Wechsel des limitierenden Substrates erfolgen, beispielsweise durch die Induktion des tac-Promoters mit Laktose und Umschaltung

von Glucosefütterung auf Laktosefütterung (Neubauer et al., 1992, Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 739-744).

Für den stabilen Erhalt der Plasmide in den Wirtszellen dienen als Selektionsmarker Gene, die eine Resistenz der Wirtszelle gegenüber einem Antibiotikum vermitteln. In die Kultur zur Produktion eines rekombinanten Proteins wird dann üblicherweise das entsprechende Antibiotikum zugegeben, daß das Wachstum von plasmidfreien Zellen, die das Resistenzgen nicht tragen, inhibiert bzw. diese abtötet. Häufig genutzte Resistenzgen/Antibiotika-Paare sind β -Lactamase/Ampicillin, Chloramphenicol-acetyltransferase/Chloramphenicol, Tetracyclin-Resistenz (Tet)-Operon/Tetracyclin, Kanamycinresistenzgen/Kanamycin.

Einige dieser Resistenzsysteme haben den Nachteil, daß das Antibiotikum durch das Resistenzgen inaktiviert wird, wie z.B. Ampicillin und Chloramphenicol (z.B. Kemp G.W. und Britz M.L., 1987, Biotechnol. Techniques 1, 157-162). Diese Inaktivierung hat zur Folge, daß sich plasmidfreie Zellen in der Kultur ungehindert vermehren können. Außerdem kann es schon bei der Vorkultur zur Freisetzung der die Resistenz vermittelnden Proteine in das Wachstumsmedium kommen, die den Abbau des Antibiotikums beschleunigen. In diesen Fällen kann der Anteil plasmidfreier Zellen an der Gesamtkultur noch erhöht sein. Weiter werden in einer großen Anzahl industrieller Prozesse aus Kostengründen oder wegen des zusätzlichen Aufwandes, der bei der nachfolgenden Reinigung anfallen würde, in der auch Restspuren des Antibiotikums beziehungsweise seiner inaktivierten Form entfernt werden müssen, keine Antibiotika eingesetzt. Auch bei solchen Prozessen entsteht meist ein bestimmter Anteil plasmidfreier Zellen.

Obwohl plasmidfreie Zellen in der Wachstumsphase häufig nur einen geringen Wachstumsvorteil haben, kommt es nach Anschaltung der Produktbildung in vielen Fällen zu einer Verminderung der Wachstumsrate der plasmidhaltigen, produzierenden Zellen und damit zu einem Überwachsen der Kultur durch die plasmidfreie Zellpopulation. Die Anreicherung plasmidfreier Zellen hat den Nachteil, daß sich der relative Anteil des Produktes an der Gesamtzellmasse verringert und in Abhängigkeit von den gewählten Aufschluß- und Reinigungsmethoden diese der Fermentation nachfolgenden Schritte erschwert werden.

Bei der Konstruktion des Vektors gibt es zwar die Möglichkeit, diese negativen Effekte einzuschränken, beispielsweise durch die Wahl des Resistenzgens, der Nutzung von alternativen, antibiotika-unabhängigen Stabilisierungssystemen (Molin und Gerdes, WO84/01172) oder durch die Nutzung modifizierter Antibiotika, die verlangsamt abgebaut

werden, trotzdem werden die problematischen Resistenzen weithin eingesetzt. Außerdem ist keines der alternativen Systeme unendlich stabil und wird nur für einen gewissen Zeitraum stabil erhalten.

Der im Patentanspruch 1 angegebenen Erfindung liegt das Problem zugrunde, das Hochwachsen der plasmidfreien Zellen nach Induktion der rekombinanten Produktsynthese in Fed-batch-Fermentationen, insbesondere im industriellen Bereich, zu unterdrücken.

Dieses Problem wird durch die im Patentanspruch 1 angegebenen Merkmale gelöst, indem die Konzentration der Kohlenstoff-/Energiequelle zyklisch oszillierend abgesenkt bzw. erhöht wird. Dies wird durch die Veränderung der Zugaberate der die Kohlenstoff-/Energiequelle enthaltenden Fütterlösung erreicht, z. B. durch entsprechende Programmierung der die Fütterlösung zudosierenden Pumpe. Auf diese Weise entstehen aufeinanderfolgende Phasen, in denen die Zellen entweder Substrat zur Verfügung haben, bzw. Substrathunger erfahren. Obwohl solche zyklische Prozeßführungen gelegentlich genutzt wurden, um z.B. Mischprobleme, die im industriellen Großmaßstab auftreten, in Kleinfementoren zu simulieren (Neubauer et al., 1995, J. Biotechnol. 43, 195-204) oder metabolische Umsatzraten zu steigern (Qian, 1998, Patent No. CN1177007), ist bisher allgemeine Auffassung, daß sich Oszillationen negativ auf die Produktbildung in rekombinanten Prozessen auswirken. Überraschenderweise können gezielte Oszillationen jedoch den Prozess positiv beeinflussen.

Bei dieser Verfahrensweise, die prinzipiell in allen rekombinanten wachstumslimitierten Prozessen angewandt werden kann, in denen die Bildung des rekombinanten Produktes unter Kohlenstofflimitation induziert wird, ist von Vorteil, daß kein Zusatz weiterer Substanzen zum Fermentationsmedium erforderlich ist, sie unabhängig vom genutzten Expressionssystem ist und sich nicht negativ auf die Produktbildung auswirkt. Besonders geeignet ist das Verfahren in Fed-batch Prozessen, bei denen ein Zucker, wie z. B. Glucose, Laktose, Arabinose oder Galaktose, oder andere organische Kohlenstoffquellen, wie z.B. Methanol, Glycerol, Acetat, Melasse oder Stärke als limitierender Nährstoff der Kultur zugesetzt werden. Dabei ist das Verfahren unabhängig vom Kultivierungsmedium und kann sowohl bei der Kultivierung auf Mineralsalzmedium wie auf Komplexmedien angewandt werden.

Insbesondere kurze Zykluszeiten von ca. einer Minute (30 sec Feeding, 30 sec Pause) sind vorteilhaft. Im Gegensatz dazu wirkt sich eine Verlängerung der Zykluszeit negativ auf die Produktbildung aus.

Diese Methode ist nicht auf *Escherichia coli* als Wirtsorganismus beschränkt, sondern kann bei allen Mikroorganismen, wie z.B. *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* oder *Pichia pastoris*, eingesetzt werden, die mittels kohlenstofflimitierten Fed-batch kultiviert werden. Sie ist auch unabhängig vom Induktionssystem. Jedoch ist sie bei der Nutzung des tac-Promoters besonders vorteilhaft.

Das Verfahren ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn die Expression des Genproduktes stark induziert wird und das Zellwachstum der produzierenden Zellen im Verhältnis zu einer nichtinduzierten Kultur negativ beeinflusst wird. Weiterhin hat diese Verfahrensweise in Prozessen Vorteile, in denen die Produktionsphase besonders lang ist, beispielsweise bei der periplasmatischen Expression rekombinanter Proteine oder wenn die Produktbildungsphase mit einem Temperaturshift verbunden ist.

Ausführungsbeispiel

Stamm und Plasmide

Escherichia coli K-12 RB791 (F⁻, IN(rrnD-rrnE)1, λ^- , lacI^qL_g; *E. coli* Stock Center, New Haven, USA) wurde als Wirt verwendet. Dieser Stamm wurde mit dem Plasmid pKK177glucC (Kopetzki et al., 1989a) transformiert, in dem das Gen der α -Glucosidase aus *Saccharomyces cerevisiae* unter Kontrolle des tac-Promoters steht. Das Plasmid enthält das β -Lactamasegen als Selektionsmarker. Zusätzlich wurde ein zweites System verwendet, in das zusätzlich zu dem Plasmid pKK177glucC noch das Plasmid pUBS520 (Brinkmann et al., 1989) transformiert wurde, das das *dnaY* Gen (Minor-tRNA *argU*, AGA/AGG) enthält.

Kultivierungsmedium und Fermentationsbedingungen

Für alle Kultivierungen wurde Glucose-Ammonium-Mineralsalzmedium (Teich et al., 1998, J. Biotechnol. 64, 197-210) verwendet. Die Startkonzentration für Glucose lag bei 5 g l⁻¹. Die Feed-Lösung enthielt 200 g Glucose kg⁻¹ und alle Komponenten des Kultivierungsmediums in den entsprechenden Konzentrationen (Ausnahme (NH₄)₂SO₄ 2.0 g l⁻¹) und 10 ml l⁻¹ der Spurenelementlösung (Holme et al., 1970), aber kein MgSO₄. Dieses wurde im Verlauf der Kultivierung zu 10 ml einer 1 M MgSO₄ Lösung per OD₅₀₀=9 zugesetzt. Ampicillin (100 mg l⁻¹) und Kanamycin (10 mg l⁻¹) wurden sowohl den Vorkulturen als auch dem Fermentationsmedium zugesetzt. Polypropylenglycol 2000 (50 %) wurde als Antischaummittel genutzt.

6

Als Fermentationsinokulum wurden Schüttelkulturen auf Fermentations-Mineralsalzmedium genutzt, die bei 37°C angezogen wurden. Alle Fermentationen wurden in 6 l Biostat ED Bioreactor mit einem Startvolumen von 4 L und bei einer Temperatur von 35°C durchgeführt. Die Kulturen wurden als Batch-Kultur gestartet. In dieser Phase wurden die Belüftungsrate und die Rührung in einem Kaskadenmodus reguliert, um den DOT auf mindestens 20% zu halten. Am Ende der Batch-Phase wurde die DOT-Kontrolle abgeschaltet und Belüftungsrate und Rührgeschwindigkeit auf 2vvm bzw. 800 rpm gesetzt. Der pH-Wert wurde mittels 25 %iger Ammoniaklösung auf 7.0 geregelt. Am Ende der Batch-Phase, bei einer Zelldichte von ca. 2 g DCW l⁻¹ (OD₅₀₀=9) wurde die Feedingpumpe mit einer konstanten Rate von 53.2 g h⁻¹ (2.6 g Glucose l⁻¹ h⁻¹) gestartet. Die Gesamtmenge zugesetzter Glucose war die gleiche in allen Kultivierungen, unabhängig vom Feed-Modus. Drei verschiedene Feedingstrategien wurden getestet: (A) kontinuierliches Feeding (Kontrollkultivierung), (B) unterbrochenes Feeding mit einem Zyklus von 1 Minute (30 Sekunden an, 30 Sekunden aus), (C) unterbrochenes Feeding mit einem Zyklus von 4 Minuten (2 Minuten an, 2 Minuten aus). Die Expression des α-Glucosidasegens wurde durch Zusatz von 1 mM IPTG 3 h nach Feedingstart induziert und die Produktbildung über einen Zeitraum von ca. 20 h nach Induktion verfolgt.

Analytische Methoden

Das Zellwachstum wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 500 nm (OD₅₀₀) verfolgt. Weiterhin wurde die mikroskopische Zellzahl in einer Zählkammer (0.02 mm Tiefe), und die Zelltrockenmasse (CDW) bestimmt (siehe Teich et al., 1998, J. Biotechnol. 64, 197-210). Die Anzahl koloniebildender Einheiten (cfu) wurde durch Ausstreichen verdünnter Proben auf Nähragarplatten ermittelt, die mindestens 3 Tage bebrütet wurden. Die Plasmidstabilität wurde darauf durch Überstempeln dieser Platten auf Selektivagar mit der *Replica plating*- Technik bestimmt. Das Verhältnis zwischen CDW, OD₅₀₀ und Zellzahl wird durch folgende Beziehung charakterisiert: 1g/l CDW entspricht einer OD₅₀₀ von 4.5±0.1 und einer Zellzahl von 1.8×10⁹ ml⁻¹. Die Glucosekonzentration wurde mit einem kommerziellen Enzymkit ermittelt.

Die Bestimmung der α-Glucosidasekonzentration erfolgte nach Auftrennung von Gesamtzellproben im SDS-Gel (5 % Sammelgel, 7 % Separationsgel). Die Expression wurde durch Scannen der Produktbande und Quantifizierung im Verhältnis zu einem jeweils auf dem Gel in verschiedenen Konzentrationen aufgetragenen Produktstandard.

Ergebnisse

E. coli RB791 pKK177glucC pUBS520 wurde mittels glucoselimitiertem Fed-batch in einem Rührreaktor kultiviert. Nach der ersten Batchphase wurde ein konstantes Feeding gestartet und drei Stunden nach Feedingstart wurde die Expression des α -Glucosidasegens durch Zusatz von 1 mM IPTG induziert. Nach Induktion kommt es zu einem Anstieg der α -Glucosidasekonzentration, wobei die spezifische Konzentration des Enzyms pro Zelle ca. 5 h nach Induktion ein Maximum durchläuft, bei längerer Kultivierung aber wieder abnimmt (s. Fig. 1c). Die Abnahme der spezifischen Konzentration der α -Glucosidase ist auf das Überwachsen der Kultur mit plasmidfreien Zellen zurückzuführen. Diese haben nach Induktion einen enormen Wachstumsvorteil, da sich die Produktion der α -Glucosidase negativ auf das Wachstum auswirkt und auch eine Inhibition der Glucoseaufnahme in den produzierenden Zellen bewirkt. Dies führt zu einer Anreicherung von Glucose im Kulturmedium. In der Kultur vorhandene Zellen, die das Produktgen nicht enthalten, werden durch den Induktor IPTG nicht beeinflusst, vielmehr wachsen sie durch die hohe Verfügbarkeit an Glucose unlimitiert weiter.

Wenn die Glucoselösung nicht kontinuierlich, sondern pulsweise zugesetzt wird (siehe Material und Methoden), wird die α -Glucosidase in ähnlicher Weise wie beim konstanten Feed nach Induktion angereichert. Allerdings kann in Abhängigkeit von der Pulslänge das Überwachsen der Kultur durch die plasmidfreie Zellpopulation verhindert werden (siehe Fig. 1d). Dieser positive Effekt auf die Unterdrückung plasmidfreier Zellen war nicht nur im in Fig. 1 dargestellten stark exprimierenden System offensichtlich, sondern auch bei der schwachen Expression der α -Glucosidase im System *E. coli* RB791 pKK177glucC (Fig. 2, Tabelle 1). Außerdem hatte das pulsweise Feeding in beiden Fällen einen leicht positiven Einfluß auf die Syntheserate nach Induktion und im ersten Fall auch auf die Stabilität des Produktes, das zu mehr als 90 % in Form von Einschußkörpern (*inclusion bodies*) vorlag.

Tabelle 1: Produktivität und Überwachsen durch plasmidfreie Zellen in glucoselimitierten Fed-batch-Kulturen von *E. coli* RB791 pKK177glucC mit und ohne pUBS520

Art der Substratzugabe während der Fed-batch-Fermentation	α -Glucosidase Ertrag [mg/g Biomasse]		Plasmidfreie Zellen [% der Gesamtpopulation]	
	3 h nach Induktion	20 h nach Induktion	3 h nach Induktion	20 h nach Induktion/12h
RB791 pKK177glucC pUBS520				
konstantes Feeding	37	30	2	72
Zyklus 1 min	38	24	1	16
Zyklus 4 min	37	6	2.5	60
RB791 pKK177glucC pUBS520				
konstantes Feeding	10	9	10	10
Zyklus 1 min	14	10	0.3	2.7
Zyklus 4 min	6	4.6	15	6.7

Die Figuren zeigen:

Fig. 1 Fed-batch Fermentationen mit *E. coli* RB791 pKK177glucC pUBS520 mit Induktion durch 1 mM IPTG. Vergleich von kontinuierlicher Zugabe der Glucose-Substratlösung (a-c; offene Symbole: ohne Induktion; gefüllte Symbole: mit Induktion) mit zyklischer Zugabe (d-f) derselben Lösung (σ : Zyklus vom 1 min; ∇ : Zyklus vom 4 min). (a,d) Zellmasse (CDW), (b,e) Glucosekonzentration, (c,f) Produktbildung (mg α -Glucosidase/g Zelltrockengewicht). Die dargestellten Daten repräsentieren eine charakteristische Fermentation von 2 durchgeführten Experimenten für die kontinuierliche Zugabe und je 1 Experiment für die zyklische Zugabe. Startzeitpunkt für die Zugabe der Substratlösung (-----), Induktion mit IPTG erfolgte bei 3 h nach Feed-Start (.....).

Fig. 2: Fed-batch Fermentationen mit *E. coli* RB791 pKK177glucC mit Induktion durch 1 mM IPTG. Vergleich von kontinuierlicher Zugabe der Glucose-Substratlösung (a-c; offenes Symbol: ohne Induktion; gefülltes Symbol: mit Induktion) mit zyklischer Zugabe (d-f) derselben Lösung (σ : Zyklus vom 1 min; ∇ : Zyklus vom 4 min). (a,d) Zellmasse (CDW), (b,e) Glucosekonzentration, (c,d) Produktbildung (mg α -Glucosidase/g Zelltrockengewicht). Weitere Erklärungen siehe Fig. 1.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Steigerung der Ausbeute von rekombinanten Proteinen in mikrobiellen Fermentationsprozessen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Konzentration der Kohlenstoff-/Energiequelle in der Kultur zyklisch oszillierend abgesenkt beziehungsweise erhöht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Oszillationen durch die Veränderung der Zugaberate der die Kohlenstoff-/Energiequelle enthaltenden Fütterlösung erzeugt werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Länge eines Zyklus geringer als 4 Minuten ist und eine einzelne zyklische Phase nicht länger als zwei Minuten andauert.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Kultur die Kohlenstoff-Energiequelle so zugesetzt wird, daß die Zuflußrate der Substratlösung nur in bestimmten zeitlichen Abschnitten des Prozesses zyklisch variiert wird.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuflußrate durch zyklisches An- und Abschalten des Zuflusses der Fütterlösung kontrolliert wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Kohlenstoff-Energie-Substrat Glucose, Glycerol, Laktose, Arabinose, Galaktose, Methanol, Acetat, Melasse oder Stärke verwendet wird.
7. Verfahren nach Anspruch 1 und 6, dadurch gekennzeichnet, daß als Kohlenstoff-Energie-Substrat Glucose verwendet wird.
8. Verfahren nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß zur Induktion der Bildung des rekombinanten Produktes in Abhängigkeit vom eingesetzten Promoter der Kultur IPTG, Laktose, Arabinose, Galaktose, Indolylacrylsäure (IAA) oder Methanol zugesetzt werden.
9. Verfahren nach Anspruch 1 und 8, dadurch gekennzeichnet, daß zur Induktion der Bildung des rekombinanten Produktes der Kultur IPTG zugesetzt wird.
10. Verfahren nach Anspruch 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß zum Induktionszeitpunkt der Bildung des rekombinanten Produktes ein Temperaturshift erfolgt.

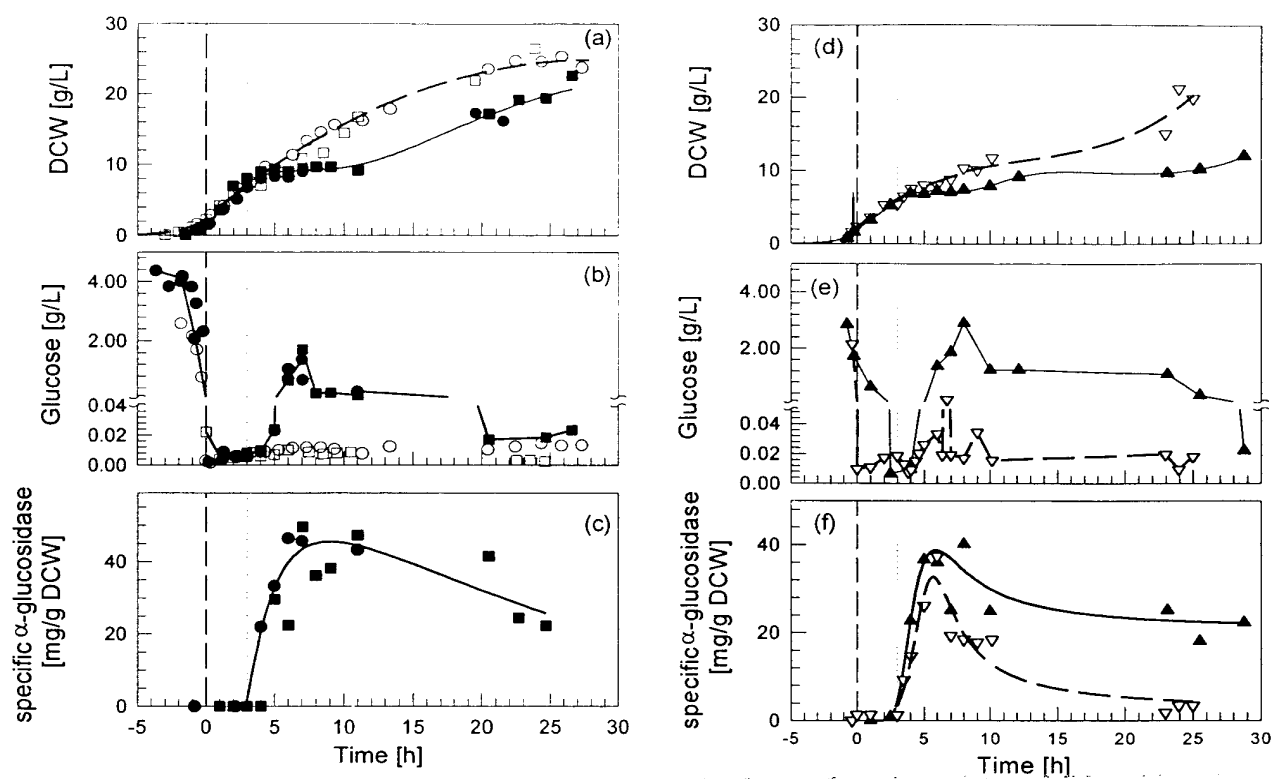


Fig. 1

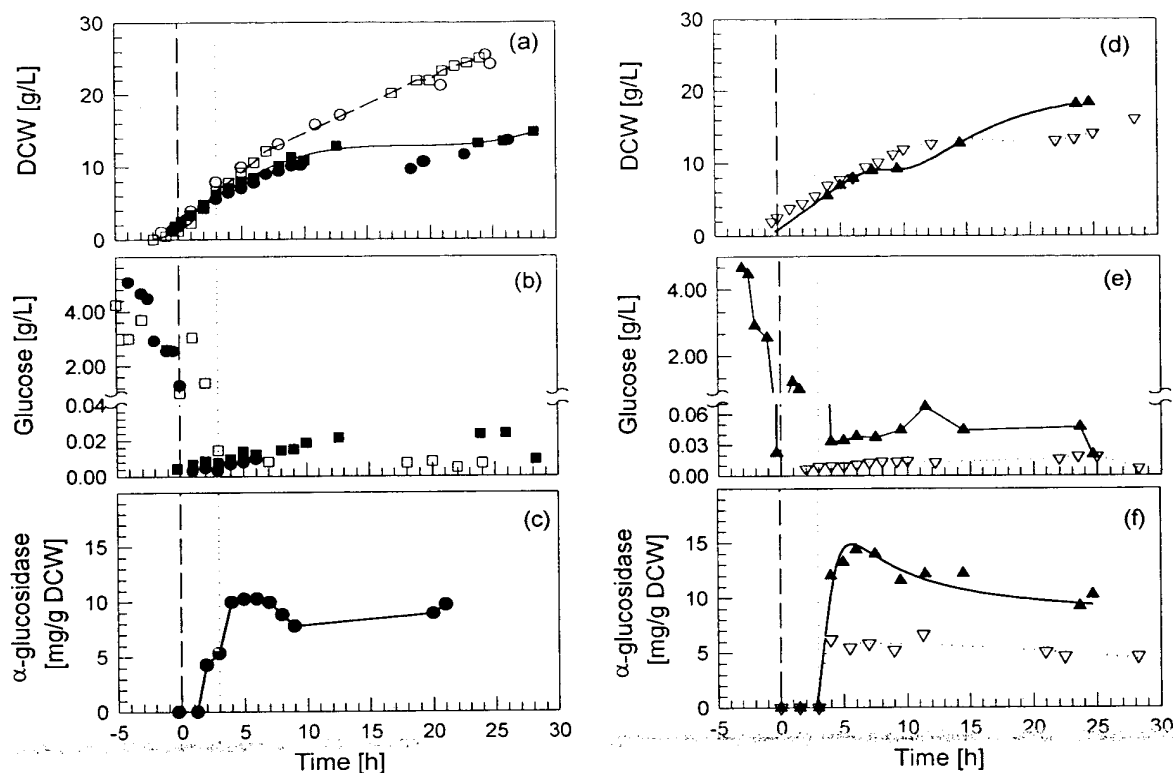


Fig. 2